

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2003 年 5 月 30 日 (30.05.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/044519 A1

(51) 国際特許分類: G01N 30/60, 27/447, 37/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/12131

(22) 国際出願日: 2002 年 11 月 20 日 (20.11.2002)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願 2001-355298  
2001 年 11 月 20 日 (20.11.2001) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 日本電気株式会社 (NEC CORPORATION) [JP/JP]; 〒108-8001 東京都港区芝五丁目7番1号 Tokyo (JP).

(JP). 川浦 久雄 (KAWAURA, Hisao) [JP/JP]; 〒108-8001 東京都港区芝五丁目7番1号 日本電気株式会社内 Tokyo (JP). 佐野 亨 (SANO, Tohru) [JP/JP]; 〒108-8001 東京都港区芝五丁目7番1号 日本電気株式会社内 Tokyo (JP). 阪本 利司 (SAKAMOTO, Toshikazu) [JP/JP]; 〒108-8001 東京都港区芝五丁目7番1号 日本電気株式会社内 Tokyo (JP). 井口 憲幸 (IGUCHI, Noriyuki) [JP/JP]; 〒108-8001 東京都港区芝五丁目7番1号 日本電気株式会社内 Tokyo (JP). 染谷 浩子 (SOMEYA, Hiroko) [JP/JP]; 〒108-8001 東京都港区芝五丁目7番1号 日本電気株式会社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 丸山 隆夫 (MARUYAMA, Takao); 〒170-0013 東京都豊島区東池袋2-38-23 SAMビル3階 丸山特許事務所内 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): CN, US.

(72) 発明者; および

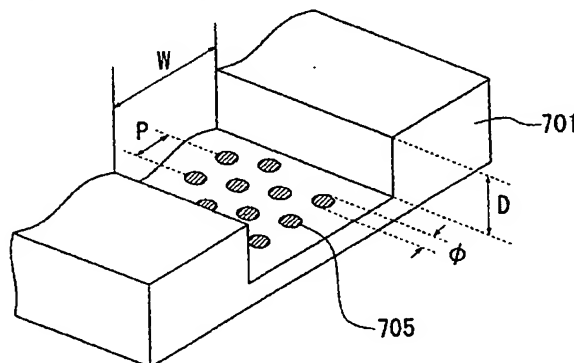
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 飯田 一浩 (IIIDA, Kazuhiro) [JP/JP]; 〒108-8001 東京都港区芝五丁目7番1号 日本電気株式会社内 Tokyo (JP). 馬場 雅和 (BABA, Masakazu) [JP/JP]; 〒108-8001 東京都港区芝五丁目7番1号 日本電気株式会社内 Tokyo

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: SEPARATION APPARATUS, METHOD OF SEPARATION, AND PROCESS FOR PRODUCING SEPARATION APPARATUS

(54) 発明の名称: 分離装置、分離方法および分離装置の製造方法



(57) Abstract: A technique for separation by which a sample can be separated in a short time with excellent resolution even when the sample amount is small and which is less apt to pose a problem such as clogging. Many hydrophobic regions 705 are disposed in a passageway for samples so that the regions 705 are apart from one another nearly evenly and that, in the areas other than the hydrophobic regions 705, the surface of a hydrophilic base 701 is exposed.

[続葉有]



---

(57) 要約:

少量の試料で短時間に優れた分解能で試料を分離でき、目詰まり等の問題も少ない分離技術を提供する。

試料の通る流路に、多数の疎水性領域 7 0 5 を略等間隔で配設し、疎水性領域 7 0 5 以外の領域は親水性基板 7 0 1 の表面が露出した構造とする。

## 明細書

分離装置、分離方法および分離装置の製造方法技術分野

本発明は、大きさや極性、水に対する親和力等の異なる試料を分離する装置および分離方法に関するものである。

従来技術

核酸やタンパク質の分析では、試料をあらかじめ分離精製したり、試料をサイズや電荷に応じて分離・分析する操作が頻繁に行われる。たとえば塩基配列決定法として広く利用されているマクサム・ギルバート法においては、DNAの一端を $^{32}\text{P}$ で標識し、これをさまざまな長さの断片が得られるように化学的に分解した後、電気泳動にかけて分離し、その後オートラジオグラフィを行って塩基配列を読み取るというプロセスが行われる。こうした分離操作は分析時間の長短を決定する重要な因子となっており、分離に要する時間を短縮することはこの分野における重要な技術的課題となっている。かかる技術的課題を解決するため、短時間で所望の物質を正確に分離できる分離装置の開発が望まれている。

このような分離装置として、従来、キャピラリー電気泳動装置が広く用いられてきた。しかしながらキャピラリー電気泳動は、測定に長時間を要する上、試料が大量に必要となる。また、分解能についても必ずしも満足できる水準にはない。

発明が解決しようとする課題

本発明は上記事情に鑑みなされたものであって、少量の試料で所望の物質を短時間で正確に分離することのできる分離装置および分離方法を提供することを目的とする。

発明の開示

本発明によれば、基板と、該基板の表面に形成された試料の通る流路と、前記

## 2

流路に設けられた試料導入部および試料排出部と、試料導入部から試料排出部に至るまでの間の流路中に設けられた試料分離部とを備える分離装置であって、前記試料分離部の表面は、２次元的に略等間隔で配置された複数の第一の領域と、該第一の領域を除く試料分離部表面を占める第二の領域と、を有し、第一の領域および第二の領域のうち、一方が疎水性領域であり、他方が親水性領域であることを特徴とする分離装置が提供される。

この分離装置において、「２次元的に略等間隔で配置された」とは、縦横方向に、ほぼ等間隔で規則正しく配置された状態のことをいう。

この分離装置において、外力付与手段をさらに備え、外力により前記試料を試料導入部から試料排出部へ移動せしめるようにした構成とすることもできる。外力の種類は、電界、表面張力、圧力等を用いることができ、外力付与手段としては、電圧印加部、ポンプ等を例示できる。外力の種類として表面張力を選択した場合は、特別な外力付与手段を設けなくてもよい。

本発明の分離装置によれば、

(i) 第一の領域を疎水性領域とし、第二の領域を親水性領域とする構成

(i i) 第一の領域を親水性領域とし、第二の領域を疎水性領域とする構成のいずれかを採用することができる。なお、本発明における親水性領域とは、疎水性領域よりも親水性が高いことをいう。親水性の程度はたとえば水接触角の測定により把握することができる。

以下、本発明に係る分離装置の原理について、上記(i)の場合を例に挙げて説明する。この場合、分離対象となる試料を、比較的親水性の高い溶媒中に溶解または分散させた状態として装置内に導入する。このような溶媒は、試料分離部において、疎水性領域(第一の領域)の表面を避け親水性領域(第二の領域)にのみ分布する。したがって、疎水性領域の間隙部が分離対象となる試料の通過する経路となり、この結果、疎水性領域間の間隔と試料のサイズとの関係によって試料分離部の通過に要する時間が決定されることとなる。これにより、サイズに応じて試料の分離がなされる。

一方、本発明においては、サイズに応じた分離のほか試料の極性に応じた分離もなされる。すなわち、親水性／疎水性の程度の異なる複数種類の試料を分離す

## 3

ることができる。上記（i）の例では、疎水性の高い試料は疎水性領域に捕捉さやすく流出時間が比較的長くなる一方、親水性の高い試料は疎水性領域に捕捉されにくく、流出時間が比較的短くなる。

このように本発明は、試料のサイズだけでなく極性をも含めた分離がなされ、従来では分離困難であった多成分系の分離を実現することができる。

本発明に係る分離装置は、障害物となる構造体により分離を行う方式とは異なり、流路表面に設けられた試料分離部を分離手段とする。膜分離の場合は膜中の細孔の大きさを精度良く制御することが必要となるが、所望のサイズ、形状の細孔を有する膜を安定的に製造することは必ずしも容易ではない。これに対し本発明は、流路の表面処理により試料分離部を形成することができ、第一の領域の間隔を制御することによって所望の分離性能が得られるため、分離目的に応じた適切な装置構成を比較的容易に実現することができる。たとえば、本発明の装置の試料分離部は、マスク開口部に疎水基を有する化合物を堆積することで作製することができ、この場合、マスク開口幅を調整することで容易に疎水領域間の間隔を調整できる。すなわち、分離目的に応じて疎水領域間の間隔を適宜に調整し、分離目的に応じた試料分離部の構成とすることができる。特に、タンパク質やDNAの分離においては、巨大サイズの物質の分離からナノオーダーの物質の分離まで、様々なサイズの物質の分離が求められる。このうちナノオーダーの物質を高い分離能で短時間で分離を行うことは、従来技術ではきわめて困難であった。本発明に係る分離装置では、第一の領域間の間隔を狭くすることで分離サイズを狭くすることができる。第一の領域間の間隔は、微細加工技術を利用することにより容易に実現できることから、ナノオーダーサイズの物質の分離を好適に実現することができる。

また本発明に係る分離装置によれば、少量の試料で短時間に分離を行うことができる。本発明による分離は、試料分離部の表面特性によって分離を行うものであるので、精密な分離を実現できる上、試料のロスが少ないので、少量の試料でも十分に高い分解能を実現でき、また、優れた分解能を実現することができるのである。

さらに本発明に係る分離装置は、試料を通過する流路の表面特性によって分離

が行われるため、目詰まり等の問題が少ない。また、使用後、試料分離部の表面に洗浄液を流す等の方法によってきわめて容易に洗浄することができる。

さらに本発明によれば、上記分離装置を用い、前記試料導入部から試料を導入し、試料中の所定成分を分離することを特徴とする試料分離方法が提供される。

この試料分離方法によれば、目詰まり等の問題を解消しつつ高精度の試料分離を実現することができる。

また本発明によれば、親水性表面を有する基板と、該基板の表面に形成された試料の通る流路と、前記流路中に設けられた試料分離部とを備える分離装置の製造方法であって、基板表面に溝を設けることにより流路を形成する工程と、

前記流路表面の少なくとも一部に開口部を有するマスクを設けた後、該開口部から前記流路表面に疎水基を有する化合物を堆積し、次いで該マスクを除去することにより、複数の疎水性領域が２次的に略等間隔で配置された複数の試料分離部を形成する工程と、

を含むことを特徴とする分離装置の製造方法が提供される。

また本発明によれば、疎水性表面を有する基板と、該基板の表面に形成された試料の通る流路と、前記流路中に設けられた試料分離部とを備える分離装置の製造方法であって、基板表面に溝を設けることにより流路を形成する工程と、

前記流路表面の少なくとも一部に開口部を有するマスクを設けた後、該開口部から前記流路表面に親水基を有する化合物を堆積し、次いで該マスクを除去することにより、複数の疎水性領域が２次的に略等間隔で配置された複数の試料分離部を形成する工程と、

を含むことを特徴とする分離装置の製造方法が提供される。

疎水基を有する化合物および親水基を有する化合物は、たとえばシランカップリング剤を用いることができる。

上記製造方法によれば、疎水表面および親水表面の混在したパターンを、歩留まり良く高精度に作製することができる。

#### 図面の簡単な説明

図１は、本発明に係る分離装置の一例を示す図である。

## 5

図 2 は、図 1 中の分離用流路の構造を詳細に示した図である。

図 3 は、図 1 中の分離用流路の構造を詳細に示した図である。

図 4 は、試料の分離方式を説明するための図である。

図 5 は、試料の分離方式を説明するための図である。

図 6 は、電気浸透流を調節するための補正電圧の印加方法を示す図である。

図 7 は、本発明に係る分離装置の概略構造を示す平面図である。

図 8 は、本発明に係る分離装置の製造方法を説明するための工程断面図である。

図 9 は、本発明に係る分離装置の製造方法を説明するための工程断面図である。

図 10 は、本発明に係る分離装置の製造方法を説明するための工程断面図である。

図 11 は、本発明に係る分離装置の製造方法を説明するための工程断面図である。

図 12 は、本発明に係る分離装置の製造方法を説明するための工程断面図である。

図 13 は、本発明に係る分離装置の概略構造を示す平面図である。

図 14 は、本発明に係る分離装置の製造方法を説明するための図である。

図 15 は、本発明に係る分離装置の概略構造を示す断面図である。

図 16 は、疎水性パッチ上に形成された気泡群の顕微鏡により拡大して図式化したものである。

図 17 は、気泡に衝突したビーズを顕微鏡により拡大して図式化したものである。

なお、符号 101a、b は、液溜めを示す。符号 102a、b は、液溜めを示す。符号 103a、b は、液溜めを示す。符号 110 は、基板を示す。符号 111 は、投入用流路を示す。符号 112 は、分離用流路を示す。符号 113 は、検出部を示す。符号 114 は、回収用流路を示す。符号 701 は、基板を示す。符号 702 は、電子ビーム露光用レジストを示す。符号 702a は、未露光部を示す。符号 702b は、露光部を示す。符号 703 は、親水性領域を示す。符号 705 は、疎水性領域を示す。符号 706 は、試料分離部を示す。符号 710 は、

ハードマスクを示す。符号 711 は、レジストマスクを示す。符号 720 は、疎水性表面処理膜を示す。符号 721 は、レジストを示す。符号 730 は、溝部を示す。符号 731 は、試料分離領域を示す。符号 902 は、ガラス基板を示す。符号 903 は、疎水性膜を示す。符号 904 は、空間を示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明において、試料分離部は、親水性表面を有する基板の一部を疎水処理する、疎水性表面を有する基板の一部を親水処理するといった方法で作製できるほか、基板表面に疎水処理と親水処理の両方の処理を行うことにより作製することもできる。

親水性表面を有する基板としては、石英基板やガラス基板等を用いることができる。疎水性表面を有する基板としては、シリコン樹脂、ポリエチレン樹脂等の樹脂基板を用いることができる。

疎水処理や親水処理は、分子中に、基板材料と吸着ないし化学結合するユニットと、疎水性または親水性の装飾基を有するユニットとを併せ持つ構造の化合物を、基板表面に付着ないし結合させること等により実現される。こうした化合物として、たとえばシランカップリング剤等を用いることができる。

シランカップリング剤としては、ビニルトリクロルシラン、ビニルトリメトキシシラン、ビニルトリエトキシシラン、 $\beta$ -(3,4-エポキシシクロヘキシル)エチルトリメトキシシラン、 $\gamma$ -グリシドキシプロピルトリメトキシシラン、 $\gamma$ -グリシドキシプロピルメチルジエトキシシラン、 $\gamma$ -グリシドキシプロピルトリエトキシシラン、 $\gamma$ -メタクリロキシプロピルメチルジメトキシシラン、 $\gamma$ -メタクリロキシプロピルトリメトキシシラン、 $\gamma$ -メタクリロキシプロピルメチルジエトキシシラン、 $\gamma$ -メタクリロキシプロピルトリエトキシシラン、N- $\beta$ -(アミノエチル) $\gamma$ -アミノプロピルメチルジメトキシシラン、N- $\beta$ -(アミノエチル) $\gamma$ -アミノプロピルトリメトキシシラン、N- $\beta$ -(アミノエチル) $\gamma$ -アミノプロピルトリエトキシシラン、 $\gamma$ -アミノプロピルトリメトキシシラン、 $\gamma$ -アミノプロピルトリエトキシシラン、N-フェニル $\gamma$ -アミノプロピルトリメトキシシラン、 $\gamma$ -クロロプロピルトリメトキシシラン、 $\gamma$ -メルカプトブ



ロピルトリメトキシシラン、3-イソシアネートプロピルトリエトキシシラン、3-アクリロキシプロピルトリメトキシシラン、3-トリエトキシシリル-N-(1, 3-ジメチル-2-チリデン)、3-チオールプロピルトリエトキシシラン等が挙げられる。

上記のうち、親水性基を有するシランカップリング剤として好ましいものは、アミノ基を有するものが挙げられ、具体的にはN-β (アミノエチル) γ-アミノプロピルメチルジメトキシシラン、N-β (アミノエチル) γ-アミノプロピルトリメトキシシラン、N-β (アミノエチル) γ-アミノプロピルトリエトキシシラン、γ-アミノプロピルトリメトキシシラン、γ-アミノプロピルトリエトキシシラン、N-フェニル-γ-アミノプロピルトリメトキシシラン等が挙げられる。

また、疎水基を有するシランカップリング剤として好ましいものは、チオール基を有するものが挙げられ、具体的には3-チオールプロピルトリエトキシシラン等が挙げられる。

カップリング剤液等の塗布方法としては、スピコート法、スプレー法、ディップ法、気相法等が用いられる。スピコート法とは、カップリング剤等、結合層の構成材料を溶解または分散させた液をスピコーターにより塗布する方法である。この方法によれば膜厚制御性が良好となる。また、スプレー法とはカップリング剤液等を基板に向けてスプレー噴霧する方法であり、ディップ法とは基板をカップリング剤液等に浸漬する方法である。これらの方法によれば、特殊な装置を必要とせず、簡便な工程で膜を形成することができる。また気相法とは、基板を必要に応じて加熱し、ここにカップリング剤液等の蒸気を流動させる方法である。この方法によっても膜厚の薄い膜を膜厚制御性良く形成することができる。このうち、シランカップリング剤溶液をスピコートする方法が好ましく用いられる。優れた密着性が安定的に得られるからである。この際、溶液中のシランカップリング剤濃度は、好ましくは0.01~5 v/v%、より好ましくは0.05~1 v/v%とする。シランカップリング剤溶液の溶媒としては、純水；メタノール、エタノール、イソプロピルアルコール等のアルコール；酢酸エチル等のエステル類等を単独または2種以上を混合して使用できる。このうち、純水

で希釈したエタノール、メタノール、および酢酸エチルが好ましい。密着性の向上効果が特に顕著となるからである。カップリング剤液等を塗布した後は、乾燥を行う。乾燥温度は特に制限がないが、通常、室温（25℃）～170℃の範囲で行う。乾燥時間は、温度にもよるが、通常は0.5～24時間とする。乾燥は空気中で行っても良いが、窒素等の不活性ガス中で乾燥させてもよい。たとえば、窒素を基板に吹き付けながら乾燥させる窒素ブロー法を用いることもできる。

本発明において、第一の領域の形状は特に制限がなく、円形、楕円形、四角形、三角形等、さまざまな形状を含む。また、疎水表面処理により所定の高さの凸状の形状を有していても良い。第一の領域のサイズも特に制限がなく、分離装置の目的および用途に応じて適宜に選択される。

本発明の分離装置は、流体中にサイズや極性の異なる資料の分離・精製に好適に用いることができる。特に生体物質の分離処理を行うのに適している。たとえば、人間や他の動物の血液や唾液等を試料とし、以下の成分の分離・濃縮に用いるのに適している。

(i) 細胞とその他の成分の分離、濃縮

(i i) 細胞を破壊して得られる成分のうち、固形物（細胞膜の断片、ミトコンドリア、小胞体）と液状分画（細胞質）の分離、濃縮

(i i i) 液状分画の成分のうち、高分子量成分（DNA、RNA、タンパク質、糖鎖）と低分子量成分（ステロイド、ブドウ糖等）の分離、濃縮

(i v) 高分子の分解産物と未分解産物の分離

本発明に係る分離装置は、微小サイズの物質の分離も可能であり、様々なサイズの核酸断片をはじめとする核酸、あるいは、アミノ酸・ペプチド・タンパク質などの有機分子、金属イオンなど等の分離・精製に適用することもできる。

本発明における第一の領域の間隔は、分離目的に応じて適宜設定される。たとえば、

(i) 細胞とその他の成分の分離、濃縮

(i i) 細胞を破壊して得られる成分のうち、固形物（細胞膜の断片、ミトコ

ンドリア、小胞体)と液状分画(細胞質)の分離、濃縮

(iii) 液状分画の成分のうち、高分子量成分(DNA、RNA、タンパク質、糖鎖)と低分子量成分(ステロイド、ブドウ糖等)の分離、濃縮といった処理において、

(i) の場合、 $1\mu\text{m}\sim 10\mu\text{m}$ 、

(ii) の場合、 $100\text{nm}\sim 1\mu\text{m}$ 、

(iii) の場合、 $1\text{nm}\sim 100\text{nm}$ 、

とする。

本発明の分離装置は、試料分離部の下流側に検出部を設けて分析装置とすることができる。また、試料排出部から所定の成分を分取する構成とすることもできる。

本発明において、第一の領域の間隔は分離目的に応じて適宜に設定される。たとえば $100\text{nm}$ 以下とすることも可能である。疎水性領域は、電子線露光等のリソグラフィ技術を利用した成膜プロセスにより作製することができるので、 $100\text{nm}$ 以下、さらには $50\text{nm}$ 以下のものも実現することができる。これにより、従来困難であった成分の分離を実現することができる。

本発明の分離装置において、試料分離部を複数含み、隣接する試料分離部間に試料が通過するパスが設けられた構成を採用することができる。このような構成を採用した場合、通常分子篩とは異なる原理で試料が分離される。本発明の分離装置では、試料のサイズと親水性/疎水性、水に対する親和性、極性の両面による分離が可能であるが、以下、サイズによる分離について着目して説明する。通常分子篩では、分子サイズの大きい物質ほど、篩によって通過を阻害される程度が大きくなる。したがって、大きいサイズの物質は、小さいサイズの物質よりも後から排出される形で分離がなされる。これに対して本発明の装置は、試料の大きさが小さいほど、試料分離部中で長い経路を通ることになるため、小さいサイズの物質は、大きいサイズの物質よりも後から排出される形で分離がなされる。サイズの大きい物質は比較的スムーズに分離領域を通過する方式となる。この結果、分離操作におけるスループットが顕著に改善される。特に核酸やタンパ

ク質等の分離においては、分子の慣性半径もきわめて広い範囲に及ぶため、巨大サイズの物質が原因となって分離効率が低下しやすい。本発明によれば、このような問題が解決されるため、核酸やタンパク質等の分離に好適に適用できる。

この発明において、試料分離部間のパスの幅は、試料分離部中の疎水性領域間の平均間隔よりも大きい構成とすることができる。このようにすれば、大きいサイズの物質は試料分離部中のパスの部分を通り、小さいサイズの物質は試料分離部を通り、そのサイズに応じて長い経路を経た後に試料分離部を通過することとなる。この結果、上記したような大きいサイズの物質が小さいサイズの物質よりも後から排出される形での分離が、より円滑になされる。

ここで、試料分離部中の第一の領域間の間隔は、試料分離部ごとに任意の値に設定することができる。したがってこの発明においては、試料分離部中の第一の領域間の距離および上記パスの幅の2種類のパラメータを任意に設定でき、これにより、サイズの分布が広い試料についても、目詰まりの発生やスループットの低下をもたらすことなく高い分解能で分離することができる。たとえば、小さいサイズの分子を高い分解能で分離するために、第一の領域間の間隔を数ナノ〜数十ナノメートルオーダーと狭くする一方、上記試料分離部中のパスの幅を大きくすることによって大きいサイズの分子を円滑に移動させ、目詰まりや分離効率の低下を防止することができる。

各試料分離部を構成する第一の領域は、略同一サイズで等間隔に形成されたものとすることができる。このようにすれば、試料分離部における分離の感度を高めることができる。試料分離部内の第一の領域が多数になると、分解能が向上する。

試料分離部は、それぞれ異なるサイズの第一の領域により構成してもよい。すなわち、各試料分離部中に、それぞれ異なるサイズおよび間隔で第一の領域が形成された構成を採用することもできる。このようにすれば、サイズの分布がきわめて広い試料についても、目詰まりの発生やスループットの低下をもたらすことなく高い分解能で分離することができる。

本発明の分離装置において、上記試料に外力を付与して上記試料を上記流路中で移動せしめる外力付与手段をさらに備えた構成を採用することができる。この

ようにすれば、外力を負荷する程度に応じて分離精度および分離に要する時間を目的に応じて適切に設定することができる。ここで、外力としては、圧力や電界を用いることが便利である。大がかりな外力付与部材が不要だからである。また、毛細管現象を利用して試料を移動させることもできる。この場合、外力付与手段が不要となり、装置の小型化に有利となる。

本発明の分離装置において分離対象となる試料としては、

(i) 細胞とその他の成分の分離、濃縮

(i i) 細胞を破壊して得られる成分のうち、固形物（細胞膜の断片、ミトコンドリア、小胞体）と液状分画（細胞質）の分離、濃縮

(i i i) 液状分画の成分のうち、高分子量成分（DNA、RNA、タンパク質、糖鎖）と低分子量成分（ステロイド、ブドウ糖等）の分離、濃縮

(i v) 高分子の分解産物と未分解産物の分離

等が挙げられる。

微小スケールのものについては、核酸断片をはじめとする核酸、あるいは、アミノ酸・ペプチド・タンパク質などの有機分子、金属イオンなど等が挙げられる。このうち、たとえば核酸またはタンパク質を試料とした場合、より効果的である。これらの試料の分離に際しては、小さいサイズの分子を高い分解能で分離しなければならないため、数ナノ～数十ナノメートルオーダーの微小な間隙が設けられた構造が必須となる。一方、巨大物質による目詰まりを効果的に抑制することも要求される。本発明によれば、これらの要求の双方に充分に対応できるため、核酸またはタンパク質の分離に好適である。

上記分離装置において、流路の断面全体にわたって形成された前記試料分離部が、スリットを介して複数設けられた構成とすることができる。このような構成とすることにより、検出部でのバンドの形状が直線的となり、検出領域を広げることが可能となり検出感度を向上することができる。

なお、本発明における分離装置は、試料分離部を備えているものであればよく、サンプル導入領域や外力付与手段は装置自体に備わっていなくてもよい。たとえば、本発明における分離装置を使い捨て型のカートリッジタイプとし、これを、所定のユニットに組み込んで使用する方式とすることもできる。

以下、図面を参照して本発明の実施の形態についてさらに説明する。

図1は、本発明に係る分離装置の一例を示す図である。基板110上に分離用流路112が形成され、これと交差するように投入用流路111および回収用流路114が形成されている。投入用流路111、分離用流路112および回収用流路114には、それぞれその両端に液溜め101a、b、102a、b、103a、bが形成されている。分離用流路112には、検出部113が設けられている。装置の外形寸法は用途に応じて適宜な値が選択されるが、通常は、図示したように、縦5mm～5cm、横3mm～3cmの値とする。試料分離部は、分離用流路112の一部に形成される。その位置は分離効率等を考慮して適切に設定される。たとえば投入用流路111と分離用流路112の交差部の近傍で投入用流路111の下流側に形成すれば、試料の分離が、より効率よく行われる。

この装置を使って試料の分離を行う方法について説明する。本実施形態において、分離対象の試料は、通常、純水、純水と親水性溶媒の混合液、緩衝液等のキャリア溶媒に溶解ないし分散した形で用いられる。キャリア溶媒としては、水とイソプロピルアルコールの混合液、トリメチルアンモニウム、ホウ酸およびエチレンジアミン四酢酸(EDTA)を含む水溶液、リン酸ナトリウム水溶液等が好適に用いられる。

分離操作にあたって、まず分離装置内の各流路をキャリア溶媒で満たしておく。次いで、試料を液溜め102a、もしくは液溜め102bに注入する。液溜め102aに注入した場合は、液溜め102bの方向へ試料が流れるように電圧を印加し、液溜め102bに注入した場合は、液溜め102aの方向へ試料が流れるように電圧を印加する。これにより、試料は投入用流路111へと流入し、結果的に投入用流路111の全体を満たす。この時、分離用流路112上では、試料は投入用流路111との交点にのみ存在し、投入用流路111の幅程度の狭いバンドを形成している。

次に、液溜め102a、液溜め102bの間への電圧印加をやめ、液溜め101aと液溜め101bの間に、試料が液溜め101bの方向へ流れるように電圧を印加する。これにより試料は分離用流路112を通過することになり、この間に、分子の大きさと荷電の強さ、および第一の領域間の隙間のサイズに応じた速

度で、分離用流路を進んでゆく。その結果、試料中の異なる分子群は、それぞれ異なる速度で移動するバンドに分離される。これらの分離されたバンドは、検出部 1 1 3 に至ると、光学的あるいは他の物理化学的な方法で検出される。光学的検出とは、例えば、分子に蛍光物質を結合させておき、検出部 1 1 3 においてレーザーを照射し、分子から発せられる蛍光を観測することである。分離されたバンドは、さらに、バンドごとに回収することができる。所望のバンドが検出部 1 1 3 を通過したことを目安に、液溜め 1 0 1 a、液溜め 1 0 1 b 間への電圧印加をやめ、代わりに液溜め 1 0 3 a、液溜め 1 0 3 b の間に電圧を印加する。すると分離用流路 1 1 2 中と、回収用流路 1 1 4 の交差点に存在するバンドは、回収用流路 1 1 4 に流れこむ。液溜め 1 0 3 a、液溜め 1 0 3 b 間への電圧印加を一定時間の後に停止すると、液溜め 1 0 3 a または液溜め 1 0 3 b に、分離されたバンドに含まれる所望の分子が回収される。

次に、分離装置中の分離用流路の構造について説明する。図 2 は、図 1 中の分離用流路 1 1 2 の構造を詳細に示したものである。図 2 中、基板 7 0 1 に深さ D の溝部が形成され、この溝部に、直径  $\phi$  の疎水性領域 7 0 5 が等間隔で規則正しく形成されている。本実施形態において疎水性領域 7 0 5 は、疎水基を有するカップリング剤を基板 7 0 1 表面に付着、結合することにより形成している。図 2 には示していないが、流路の上部には通常、蓋を設ける。これにより溶媒の蒸発が抑えられる。また、圧力により流路中の試料を移動せしめることが可能となる。但し蓋を設けない構造とすることも可能である。

図 3 中、各部の寸法は、たとえば以下のようにする。

W : 10 ~ 20 ミクロン

D : 50 nm ~ 10 ミクロン

$\Phi$  : 10 ~ 1000 nm

d : 10 nm ~ 10 ミクロン

p : 50 nm ~ 10 ミクロン

各部のサイズは、分離目的に応じて適宜設定される。たとえば、p については、

(i) 細胞とその他の成分の分離、濃縮

(ii) 細胞を破壊して得られる成分のうち、固形物（細胞膜の断片、ミトコ

ンドリア、小胞体)と液状分画(細胞質)の分離、濃縮

(i i i) 液状分画の成分のうち、高分子量成分(DNA、RNA、タンパク質、糖鎖)と低分子量成分(ステロイド、ブドウ糖等)の分離、濃縮

といった処理において、

(i) の場合、 $1\mu\text{m}\sim 10\mu\text{m}$ 、

(i i) の場合、 $100\text{nm}\sim 1\mu\text{m}$ 、

(i i i) の場合、 $1\text{nm}\sim 100\text{nm}$ 、

とする。

また、深さDの大きさは、分離性能を支配する重要な因子であり、分離対象となる試料の慣性半径の1～10倍程度とすることが好ましく、1～5倍程度とすることがより好ましい。

図3は、図2の構造の上面図(図3(a))および側面図(図3(b))である。疎水性領域705は、通常、 $0.1\sim 100\text{nm}$ 程度の膜厚となる。疎水性領域705以外の部分は基板701の表面が露出した状態となっている。基板701としてガラス基板のように親水性材料を選択することにより、図2の構造において、親水性表面上に疎水性表面が所定のパターンをもって形成された構成となり、試料分離機能が発現する。すなわち、キャリア溶媒として上記したような親水性の緩衝液等を用いると、試料は親水性表面上のみを通過し、疎水性表面上は通過しない。このため、疎水性領域705が試料通過の障害物として機能し、試料分離機能が発現するのである。

次に疎水性領域705のパターン形成による分離方式について、分子サイズに着目して説明する。分離方式として主として2つの方式が考えられる。一つは、図4に示す分離方式である。この方式では、分子サイズが大きい程、疎水性領域705が障害となり、図示した分離部を通過するのに要する時間が長くなる。分子サイズの小さいものは、疎水性領域705間の間隙を比較的スムーズに通過し、分子サイズが大きいものに比べて短時間で分離部を通過する。

図5は、図4とは逆に大きな分子が早く、小さな分子が遅く流出する方式となっている。図4の方式では、試料中に巨大なサイズの物質を含む場合、このような物質が疎水性領域705の間隔を塞いでしまい、分離効率が低下する場合があ



る。図5に示す分離方式では、このような問題が解消される。図5中、分離用流路112中に複数の試料分離部706が離間して形成されている。各試料分離部706内には、それぞれ、略同一サイズの疎水性領域705が等間隔に配置されている。

試料分離部706間には、大きな分子が通り抜けられるような広幅のパスが設けられているため、図4とは逆に大きな分子が早く、小さな分子が遅く流出するようになる。分子サイズが小さいほど、分離領域中でトラップされて長い経路を通ることになる一方、大きいサイズの物質は、隣接試料分離部706間のパスを円滑に通過するからである。この結果、小さいサイズの物質は、大きいサイズの物質よりも後から排出される形で分離がなされる。サイズの大きい物質は比較的にスムーズに分離領域を通過する方式となるので、前述した疎水性領域705間に大きな分子がトラップされて分離効率が低下するといった問題が低減され、分離効率が顕著に改善される。こうした効果をより顕著にするためには、隣接試料分離部706間のパスの幅を、試料分離部706中の疎水性領域705間の間隙よりも大きくするのが良い。パスの幅は、疎水性領域705間の間隙の好ましくは2~200倍程度、より好ましくは5~100倍程度とする。

なお、図5の例では、各試料分離部に同じサイズ、間隔の疎水性領域705を形成しているが、それぞれの試料分離部で、異なるそれぞれサイズ、間隔の疎水性領域705を形成してもよい。

分子サイズの物質を分離する場合、試料分離部間のパスの幅及び、試料分離部内の第一の領域の間隔は、分離しようとする成分（核酸、アミノ酸、ペプチド・タンパク質などの有機分子、キレートした金属イオンなどの分子・イオン）のサイズに合わせて適宜に選択される。たとえば第一の領域の間隔は、試料中に含まれる最小サイズの分子の慣性半径と同程度か、それよりもわずかに小さめあるいは大きめとするのが好ましい。具体的には、試料中に含まれる最小サイズの分子の慣性半径と、第一の領域の間隔との差異を、100nm以内、より好ましくは50nm以内、最も好ましくは10nm以内とする。第一の領域の間隔を適切に設定することにより、分離能が一層向上する。

隣接する試料分離部間の間隔（パスの幅）は、試料中に含まれる最大サイズの

分子の慣性半径と同程度か、それよりもわずかに小さめあるいは大きめとするのが好ましい。具体的には、試料中に含まれる最大サイズの分子の慣性半径と試料分離部間の間隔との差異を、当該分子の慣性半径の10%以内、より好ましくは5%以内、最も好ましくは1%以内とする。試料分離部間の間隔が広すぎると、サイズの小さい分子の分離が充分に行われなくなることがあり、試料分離部間の間隔が狭すぎると、目詰まりが発生しやすくなる場合がある。

また、上記実施形態では疎水性領域を一定間隔で配設した例を示したが、試料分離部内において疎水性領域を異なる間隔で配設することもできる。こうすることで大・中・小等の複数の大きさの分子・イオンを効率的に分離することができる。また、疎水性領域の配置に関し、試料の進行方向に対して互い違いに疎水性領域を配置する方法を採用することも有効である。こうすることにより、目的の成分を効率的に分離することができる。

本発明の分離装置では、図6に示すように、分離用流路112の両端に電圧が印加され、これにより試料が分離用流路112中を移動する。ここで、試料に外力を与えるための電圧以外に、電気浸透流を抑制するための電圧を印加してもよい。図6の構成では、この目的のため、基板にゼータ補正電圧を印加している。このようにすれば電気浸透流が抑制され、測定ピークのブロードニングを有効に防止することができる。

次に、図13に示す分離装置の製造方法について図面を参照して説明する。

図13の分離装置は、図1の分離装置に対して、分離回収用流路を省略した構造となっている。この装置では、試料の分離物を分種することは目的とせず、検出部113により分離された成分の分析を行うものである。分離用流路112中に、試料分離領域が設けられている。この試料分離領域の表面は、2次元的に略等間隔で配置された複数の疎水性領域と、疎水性領域を除く試料分離部表面を占める親水性領域とからなっている。

図13の分離装置は、まず、図7(a)に示すように、基板701表面に溝部730を設け、次いで図7(b)のように、溝部730中の所定箇所に試料分離領域731を形成することにより得られる。以下、図7(a)の基板701上に溝部730を形成する工程について図8を参照して説明する。なお、本実施例で

は基板701としてガラス基板を用いた例について説明する。

初めに、基板701上にハードマスク710、レジストマスク711を順次形成する(図8(a))。次いで、レジストマスク711に所定の開口部を設ける(図8(b))。続いて、開口部を設けたレジストマスク711をマスクとしてドライエッチングを行い、図8(c)の状態とする。エッチングガスとしては、SF<sub>6</sub>などを用いる。続いて、バッファードフッ酸などのエッチング液を用いて、基板701をウェットエッチングする。通常、エッチング深さを1μm程度とする。図8(d)は、このエッチングが終了した状態を示す。最後にハードマスク710及びレジストマスク711を除去する(図8(e))。以上の工程により図7(a)に示すような溝部730が形成される。

図7(a)における溝部730の形成工程において、溝部730の表面を親水性とし、それ以外の基板701表面を疎水表面とすることもできる。以下、このような構造の形成工程について図9を参照して説明する。まず、図8(e)で得られた構造に対して、全面に疎水性表面処理膜720を形成する(図9(a))。疎水性表面処理膜720を構成する材料としては、たとえば、3-チオールプロピルトリエトキシシランが例示される。

続いて基板表面にレジスト721をスピンコート法により塗布・乾燥する(図9(b))。次いで溝部に対応してレジスト721に開口部を設ける(図9(c))。次に、開口部を設けたレジスト721をマスクとして、ドライエッチングを行う(図9(d))。その後、レジスト721をアッシング及び剥離液処理により除去する。以上の工程を実施することにより図9(e)の状態となる。すなわち、試料流路溝の内壁は、ガラス材料からなる基板701の親水性表面が露出する一方、それ以外の部分は疎水性表面処理膜720により覆われた構造となる。このため、キャリア溶媒として親水性溶媒を用いれば、試料が溝の外部に流出することがない。

続いて、図7(b)における試料分離領域731の形成工程について図10を参照して説明する。初めに、図10(a)のように、基板701上に電子ビーム露光用レジスト702を形成する。続いて、電子ビームを用い、電子ビーム露光用レジスト702を所定の形状にパターン露光する(図10(b))。露光部分を

溶解除去すると、図10(c)のように所定の形状にパターニングされた開口部が形成される。その後、図10(d)のように酸素プラズマアッシングを行う。なお、酸素プラズマアッシングは、サブミクロンオーダーのパターンを形成する際には必要となる。酸素プラズマアッシングを行えばカップリング剤の付着する下地が活性化し、精密なパターン形成に適した表面が得られるからである。一方、ミクロンオーダー以上の大きなパターンを形成する場合においては必要性が少ない。

アッシング終了後、図11(a)の状態となる。図中、親水性領域703はレジスト残さ及び汚染物が堆積して形成されたものである。この状態で、疎水性領域705を形成する(図11(b))。疎水性領域705を構成する膜の成膜法としては、たとえば気相法を用いることができる。この場合、密閉容器中に基板と疎水基を有するカップリング剤を含む液とを配置し、所定時間放置することにより膜を形成する。この方法によれば、基板表面に溶剤等が付着しないため、所望どおりの精密なパターンの処理膜を得ることができる。他の成膜法としてスピコート法を用いることもできる。この場合、疎水基を有するカップリング剤溶液を塗布して表面処理を行い疎水性領域705を形成する。疎水基を有するカップリング剤としては、3-チオールプロピルトリエトキシシランを用いることができる。成膜方法として、ほかにディップ法等を用いることもできる。疎水性領域705は、親水性領域703の上部には堆積せず、基板701の露出部のみに堆積するため、図3に示すように、多数の疎水性領域705が離間して形成された表面構造が得られる。

以上述べたプロセスの他、以下のような方法により上記と同様の表面構造を得ることもできる。この方法では、図10(c)のようにパターニングされた未露光部702aを形成した後、酸素プラズマアッシングを行わずに図12(a)のようにレジスト開口部に3-チオールプロピルトリエトキシシランを堆積して疎水性領域705を形成する。その後、未露光部702aを選択的に除去できる溶媒を用い、ウェットエッチングを行って、図12(b)の構造を得る。この際、溶媒としては、疎水性領域705を構成する膜に損傷を与えないものを選択することが重要である。このような溶媒として、たとえばアセトン等を例示すること

ができる。

上記実施の形態では、流路溝部に疎水性領域を形成したが、これ以外に以下のような方法を採用することもできる。まず図14(a)、(b)のように二種類の基板を用意する。図14(a)の基板は、ガラス基板901上に3-チオールプロピルトリエトキシシラン等の疎水基を有する化合物からなる疎水性膜903が形成された構成となっている。疎水成膜903は、所定のパターンニング形状にて形成される。この疎水成膜903の設けられた箇所が試料分離部となる。一方、図14(b)の基板は、ガラス基板902表面にストライプ状の溝が設けられた構成となっている。この溝の部分が試料流路となる。疎水成膜903の形成方法は、上記したとおりである。ガラス基板902表面にストライプ状の溝も上記したとおり、マスクを用いたウェットエッチングにより容易に作製することができる。これらを図15のように張り合わせることによって、本発明に係る試料分離装置を得ることができる。2枚の基板によって形成される空間904が試料流路となる。この方法によれば、平坦な表面に疎水成膜903を形成することとなるので、製造が容易であり、製造安定性が良好である。

カップリング剤膜の作製方法としては、"NATURE, vol. 403, 13, January (2000年)"に記載されているように、LB膜引き上げ法により基板全面にシランカップリング剤からなる膜を形成し、親水性/疎水性のマイクロパターンを形成することができる。

さらに、この疎水性処理あるいは親水性処理によって、流路自体を形成することも可能である。

疎水性処理をもって流路を形成する場合、ガラス基板など親水性の基板を用いて、流路の壁に相当する部分を疎水性領域で形成する。水は、疎水性領域を避けて浸入し、流路を形成する。

流路にはフタを被せても被せなくても良いが、被せる場合には基板から数 $\mu\text{m}$ の隙間をあけて被せる。隙間は、フタの端部にのりしろを設け、PDMS(ポリジメチルシロキサン)やPMMA(ポリメチルメタクリレート)などの粘稠性の樹脂を接着剤(糊)として用いて基板に接着することで形成できる。端部付近だけ接着しただけでも水は疎水性領域を避け流路部分にだけ侵入することから、流

路が形成される。

逆に、親水性処理によって流路を形成する場合には、疎水性の基板を用いるか、もしくは基板にシラザン処理等で疎水性とした基板表面に、流路部分を親水性処理を行い親水性領域を有する流路を形成することができる。このようにして水は、親水性領域にのみ浸入するので流路が形成される。

前記疎水性処理、あるいは親水性処理はスタンプやインクジェットなどの印刷技術を用いて行うことができる。

例えば、スタンプによる方法では、PDMS 樹脂が用いられる。PDMS 樹脂は、シリコンオイルを重合させて樹脂化するが、PDMS 樹脂は樹脂化した後も分子間隙にシリコンオイルが充填された状態となっている。そのため、PDMS 樹脂を親水性の表面、例えば、ガラス表面に接触させると接触した部分のガラス面が強い疎水性となり水をはじく。これを利用して、流路部分を凹部として形成した PDMS ブロックを親水性の基板にスタンプすることにより、前記の疎水性処理による流路が簡単に製造できる。

なお、インクジェットプリンタ等を用いても行うことができる。

このインクジェットプリンタ等を用いる場合には、粘稠性が低いタイプのシリコンオイルをインクジェットプリンタのインクとして用い、親水性の樹脂薄膜、例えばポリエチレン、PET（ポリエチレンテレフタレート）、酢酸セルロース（セロハン）などの紙状のものをを用いることができる。流路壁部分にシリコンオイルが付着するようなパターンに印刷することによって疎水化することもできる。

さらに、疎水性表面処理パッチ（疎水性パッチ）、あるいは親水性表面処理パッチ（親水性パッチ）を用いて、前記流路中に特定のサイズより小さい物質を通過し、それ以上のサイズの物質を通過させないようなフィルタを作製することもできる。

例えば疎水性パッチを用いてフィルタを構成する場合、パッチを一定の間隔をあけて直線的に配置することにより、破線状のフィルタパターンを得ることができる。このような疎水性パッチの間隔は、通過させたい物質のサイズよりも大きくし、通過させたくない物質のサイズよりも小さくする。100  $\mu\text{m}$  以上の物質を除去したい場合には、疎水性パッチどうしの間隔は、100  $\mu\text{m}$  より狭く、例

例えば  $50\text{ }\mu\text{m}$  に設定する。

フィルタは、流路を形成するための疎水性領域パターンと、前記したような破線状に形成された疎水性パッチのパターンを一体に形成することによって作製できる。このような作製方法としては、前述のフォトリソグラフィーとSAM膜形成による方法、スタンプによる方法、インクジェットによる方法等を挙げることができる。

なお、流路中にフィルタを作製する場合には、流れに直角にフィルタ面を設ける場合と、流れに平行に設ける場合とがありうる。このうちフィルタ面を流れに平行に設ける場合には、直角に設ける場合と比べて、物質が詰まり難く、フィルタの面積を広く取れるため好ましい。この場合、流路部分の幅を広め（例えば、 $1000\text{ }\mu\text{m}$ ）とし、その中央部分に  $50\text{ }\mu\text{m} \times 50\text{ }\mu\text{m}$  の正方形の疎水性パッチを、 $50\text{ }\mu\text{m}$  の隙間をあけて流路の流れの方向に形成して、流路を縦に2分割するように配置する。分割された流路の一方の側から、分離したい物質を含む液体を導入すると、その液体に含まれる  $50\text{ }\mu\text{m}$  よりも大きな物質が除かれた濾液が、他方の流路によって濾し取られて生成される。

本発明を、以下に実施例により説明するが、本発明は実施例に限定されて解釈されない。

### 実施例

細胞大の物質を、その物質の大きさに応じて分離するための流路を試作した。

細胞は、 $10\text{ }\mu\text{m}$  から  $1\text{ }\mu\text{m}$  の大きさである、特に血液中の赤血球は  $\phi 7.5\text{ }\mu\text{m}$ 、白血球は  $\phi 10\text{ }\mu\text{m}$ 、血小板は  $\phi 2\text{ }\mu\text{m}$  程度であり、一方細菌は  $1\text{ }\mu\text{m}$  程度であることから、 $\phi 1\text{ }\mu\text{m}$ 、 $\phi 10\text{ }\mu\text{m}$  の2種類の蛍光ビーズ（ポリサイエンス社 Fluoresbright Carboxylate (2.5%Solid-Latex)) を分離対象として用いた。これらを観察することにより、

(1) 疎水性表面処理によるパッチ（疎水性パッチ）の上に気泡が形成されること。

(2) ビーズは、パッチ上の気泡の内部には浸入できず、疎水性パッチ上の気泡が流路中の障害物としての機能を果たすこと。

(3) 2種類のビーズとも、疎水性パッチ上の気泡との接触によって移動速度が低下すること。

(4) その効果は、 $\phi 10 \mu\text{m}$ のビーズの方が大きいこと。

を確認した。

分離用流路は、次の手順で試作した。

24mm×50mmの顕微鏡用カバーガラスの中央付近の長手方向に幅10mm×長さ50mmの分離領域を形成した。分離領域は、 $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ の正方形の疎水性パッチを、パッチ間の隙間が $200 \mu\text{m}$ になるように正方格子に配置したパターンで埋め尽くした。

この疎水性パッチは、カバーガラスの上に、前記正方形をネガレジスト(S1818)を用いた通常の写真リソグラフィーで露光し、正方形部分のレジストを現像除去した。その表面を酸素プラズマアッシング(350W, 0.5 Torr, 10分間)した後、シラザン蒸気を露出したガラス面に曝露し、疎水性のシラザンSAM膜を形成した。その後レジストをアセトンで除去した。

こうしてできた2枚のカバーガラスの、一方を、10cm×10cmのスライドガラスに瞬間接着剤を用いて貼り付け、その分離領域以外の部分に厚さ $18 \mu\text{m}$ のポリエチレンシートをのせ、その後処理面どうしが向き合うように、もう一枚のカバーガラスをのせてはさむことによって分離用流路を形成した。

こうしてできた幅10mm×長さ50mm×深さ $18 \mu\text{m}$ の分離流路の一端に1×TBEバッファをピペットでたらして充填した。1×TBEバッファは、毛細管効果により自動的に分離用流路を満たした。

図16は、TBEバッファを導入した後に形成された気泡のパターンである。疎水性パッチで指定された位置に丸い気泡が形成され、流路断面に空気の柱を形成している様子がわかる。気泡と気泡の間隔は、 $300 \mu\text{m}$ である。

1×TBEが充填された前記流路の一方の端に、 $0.5 \mu\text{l}$ のビーズ懸濁液を滴下した。2種類のビーズは、観察に適当な濃度まで1×TBEバッファに適宜希釈懸濁したものを $0.5 \mu\text{l}$ 流路の端に滴下した。滴下したビーズ溶液は、毛細管現象によって、流路中に浸入して止まった。2種類のビーズは、顕微鏡下で大きさの違いにより明瞭に区別できた。



次に、分離用流路の同じ端に、 $200\mu\text{m}$ の $1\times\text{TBE}$ バッファを一気に滴下した。滴下されたバッファは、分離用流路に自動的に浸入し、他の端から溢れだした。その過程で、流路端にあったビーズ懸濁液は分離流路中を押し流されていった。その流れの様子をCCDカメラで観察した。

TBE バッファを投入して時間が経ちすぎると、 $\phi 10\mu\text{m}$ のビーズは、流路底面に沈んでしまうため、ビーズが浮遊している投入から3秒の間を上記したように観察して評価した。

図17に、ビーズの衝突の様子を示す。ビーズは、図の右手から左手方向へ向かって流速が約 $300\mu\text{m}/\text{秒}$ で流れている。2種類のビーズとも、気泡以外の部分では流れに乗ってほぼ同じ速さで運動していたが、疎水性パッチ上の気泡に衝突するとともに一時停止した。その後、気泡を回りこむように流れてゆくが、その移動スピードは気泡以外の部分の流れの速度よりも3分の1程度に減少した。これは、疎水性パッチとその上の気泡が、ビーズの運動を阻害する効果を持つことを示している。その回り込みの速度は、 $\phi 10\mu\text{m}$ のビーズ（図中、番号1で示した）の方が明らかに遅く、小さいビーズ（図中、番号2で示した。図中シャッタースピードの関係で筋状に写っている）の3分の2程度であった。これは、疎水性パッチとの接触によって、ビーズの大きさによって回り込みによる速度差が生じることを示しており、これによって分離効果があることが分かる。疎水性パッチを、さらにより密なパターンとして形成すれば、ビーズの衝突頻度を増加させることができ、その分離効果はさらに顕著になると期待される。

#### 産業上の利用可能性

以上説明したように本発明によれば、試料分離部の表面に親水性領域および疎水性領域からなるパターンが形成されており、その表面特性によって試料の分離が行われる。すなわち、試料分離部の表面に離間して形成される親水性領域または疎水性領域が篩としての機能を有し、これにより目的の成分が効率的に分離される。この際、試料の分離が、試料のサイズおよび極性によって行われるため、従来にない優れた分離性能を実現することができる。また、表面加工によって試料分離部を形成できるので、製造安定性に優れる。また、表面特性によって分離

## 24

がなされるので、試料が少量で済み、分離に要する時間も短時間となる。さらに、目詰まりの問題が解消される上、使用後、試料分離部の表面に洗浄液を流す等の方法によってきわめて容易に洗浄することができる。したがって、高精度の分離特性と優れた操作性の両方が実現される。

## 請求の範囲

1. 基板と、該基板の表面に形成された試料の通る流路と、前記流路に設けられた試料導入部および試料排出部と、試料導入部から試料排出部に至るまでの間の流路中に設けられた試料分離部とを備える分離装置であって、前記試料分離部の表面は、2次元的に略等間隔で配置された複数の第一の領域と、該第一の領域を除く試料分離部表面を占める第二の領域と、を有し、第一の領域および第二の領域のうち、一方が疎水性領域であり、他方が親水性領域であることを特徴とする分離装置。

2. 請求項1に記載の分離装置において、外力付与手段をさらに備え、外力により前記試料を試料導入部から試料排出部へ移動せしめるようにしたことを特徴とする分離装置。

3. 請求項1または2に記載の分離装置において、前記試料分離部の下流側に検出部を備えたことを特徴とする分離装置。

4. 請求項1乃至3いずれかに記載の分離装置において、前記疎水性領域は、疎水基を有する化合物を含む膜により構成されたことを特徴とする分離装置。

5. 請求項4に記載の分離装置において、前記疎水基を有する化合物は、疎水基を有するシランカップリング剤であることを特徴とする分離装置。

6. 請求項4または5に記載の分離装置において、前記疎水基はチオール基であることを特徴とする分離装置。

7. 請求項1乃至6いずれかに記載の分離装置において、前記親水性領域は、親水基を有する化合物を含む膜により構成されたことを特徴とする分離装置。

8. 請求項7に記載の分離装置において、前記親水基を有する化合物は、親水基を有するシランカップリング剤であることを特徴とする分離装置。

9. 請求項8に記載の分離装置において、前記シランカップリング剤はアミノ基を有する化合物であることを特徴とする分離装置。

10. 請求項1乃至9いずれかに記載の分離装置において、前記試料分離部を複数備えたことを特徴とする分離装置。

11. 請求項10に記載の分離装置において、隣接する試料分離部の間隔

が、各試料分離部を構成する第一の領域の間隔よりも広いことを特徴とする分離装置。

12. 請求項10または11に記載の分離装置において、各試料分離部における第一の領域の間隔が互いに異なることを特徴とする分離装置。

13. 請求項1乃至12いずれかに記載の分離装置を用い、前記試料導入部から試料を導入し、試料中の所定成分を分離することを特徴とする試料分離方法。

14. 親水性表面を有する基板と、該基板の表面に形成された試料の通る流路と、前記流路中に設けられた試料分離部とを備える分離装置の製造方法であって、基板表面に溝を設けることにより流路を形成する工程と、

前記流路表面の少なくとも一部に開口部を有するマスクを設けた後、該開口部から前記流路表面に疎水基を有する化合物を堆積し、次いで該マスクを除去することにより、複数の疎水性領域が2次元的に略等間隔で配置された複数の試料分離部を形成する工程と、

を含むことを特徴とする分離装置の製造方法。

15. 請求項14に記載の分離装置の製造方法において、前記化合物は、疎水基を有するシランカップリング剤であることを特徴とする分離装置の製造方法。

16. 請求項14または15に記載の分離装置の製造方法において、前記疎水基はチオール基であることを特徴とする分離装置の製造方法。

17. 疎水性表面を有する基板と、該基板の表面に形成された試料の通る流路と、前記流路中に設けられた試料分離部とを備える分離装置の製造方法であって、基板表面に溝を設けることにより流路を形成する工程と、

前記流路表面の少なくとも一部に開口部を有するマスクを設けた後、該開口部から前記流路表面に親水基を有する化合物を堆積し、次いで該マスクを除去することにより、複数の疎水性領域が2次元的に略等間隔で配置された複数の試料分離部を形成する工程と、

を含むことを特徴とする分離装置の製造方法。

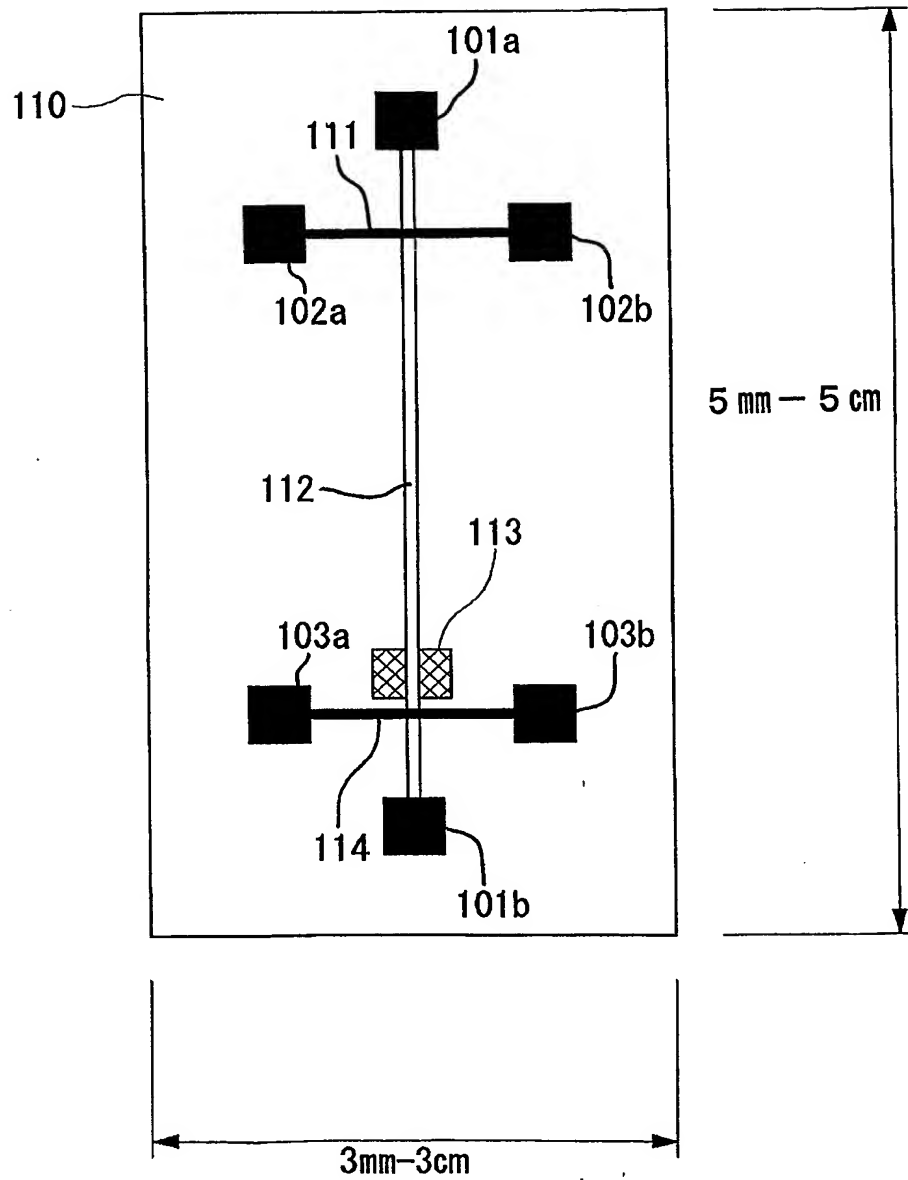
18. 請求項17に記載の分離装置の製造方法において、前記化合物は、

親水基を有するシランカップリング剤であることを特徴とする分離装置の製造方法。

19. 請求項18に記載の分離装置の製造方法において、前記シランカップリング剤は、アミノ基を有する化合物であることを特徴とする分離装置の製造方法。

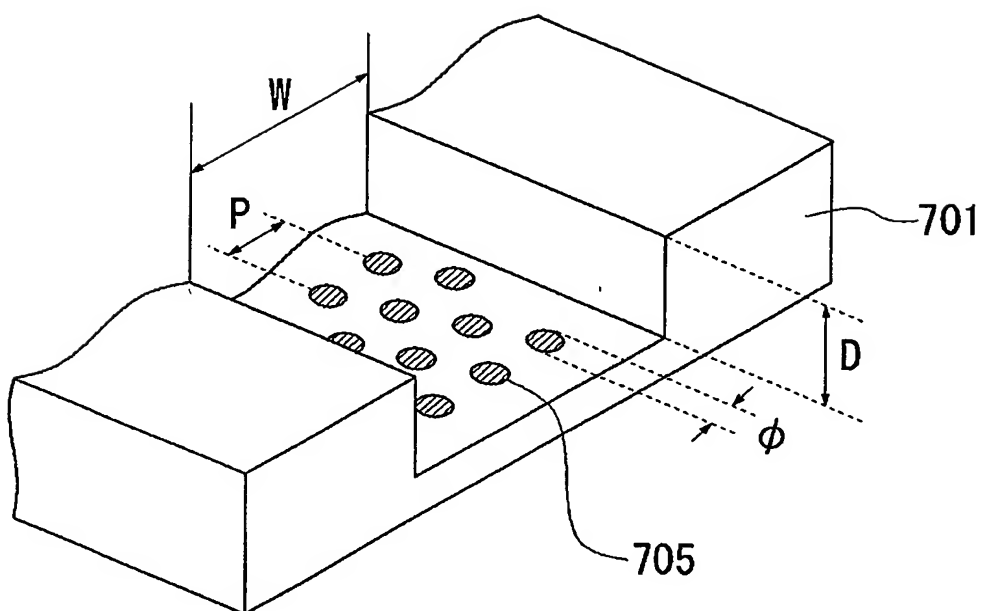
1/17

図 1



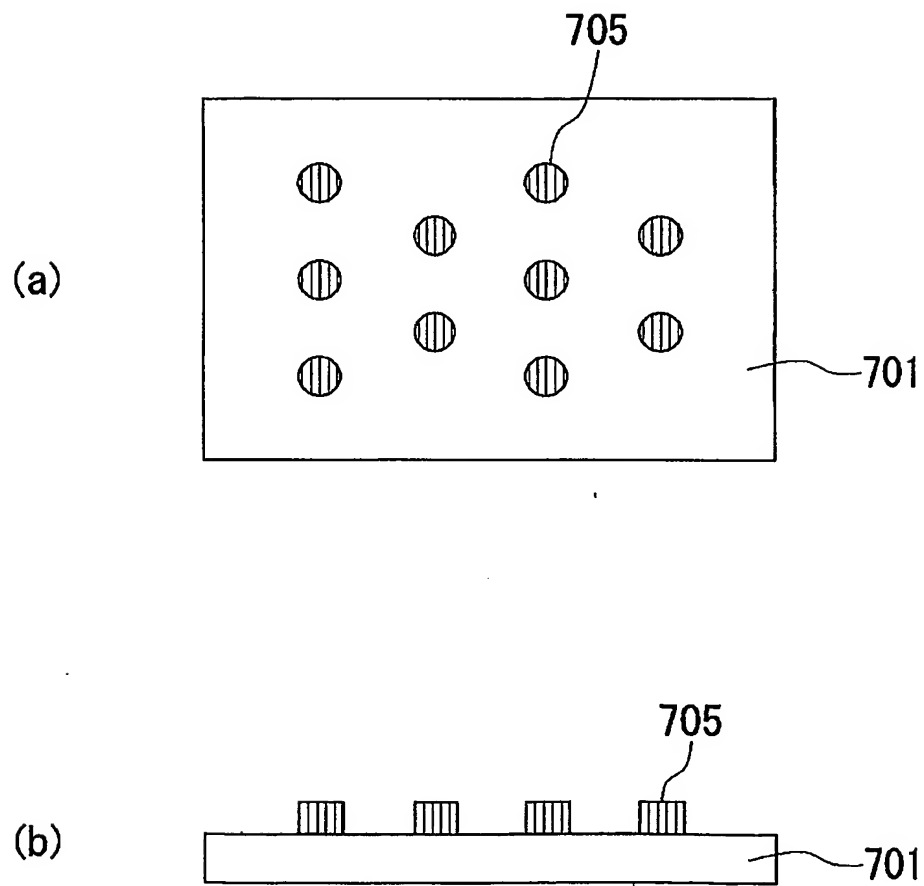
2/17

図 2



3/17

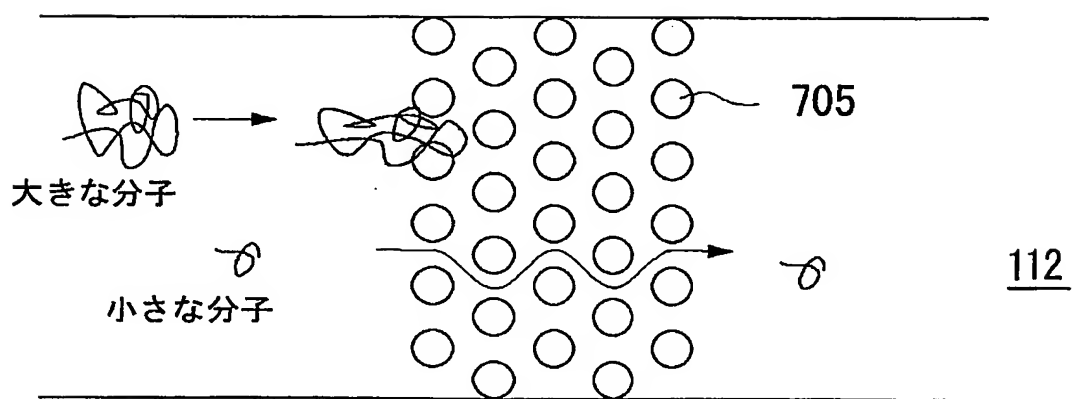
図 3





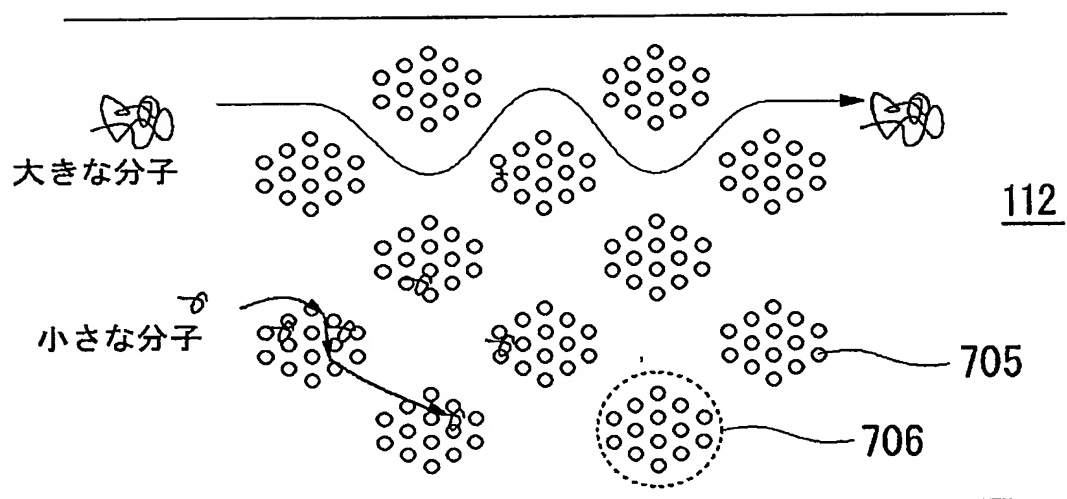
4/17

図 4



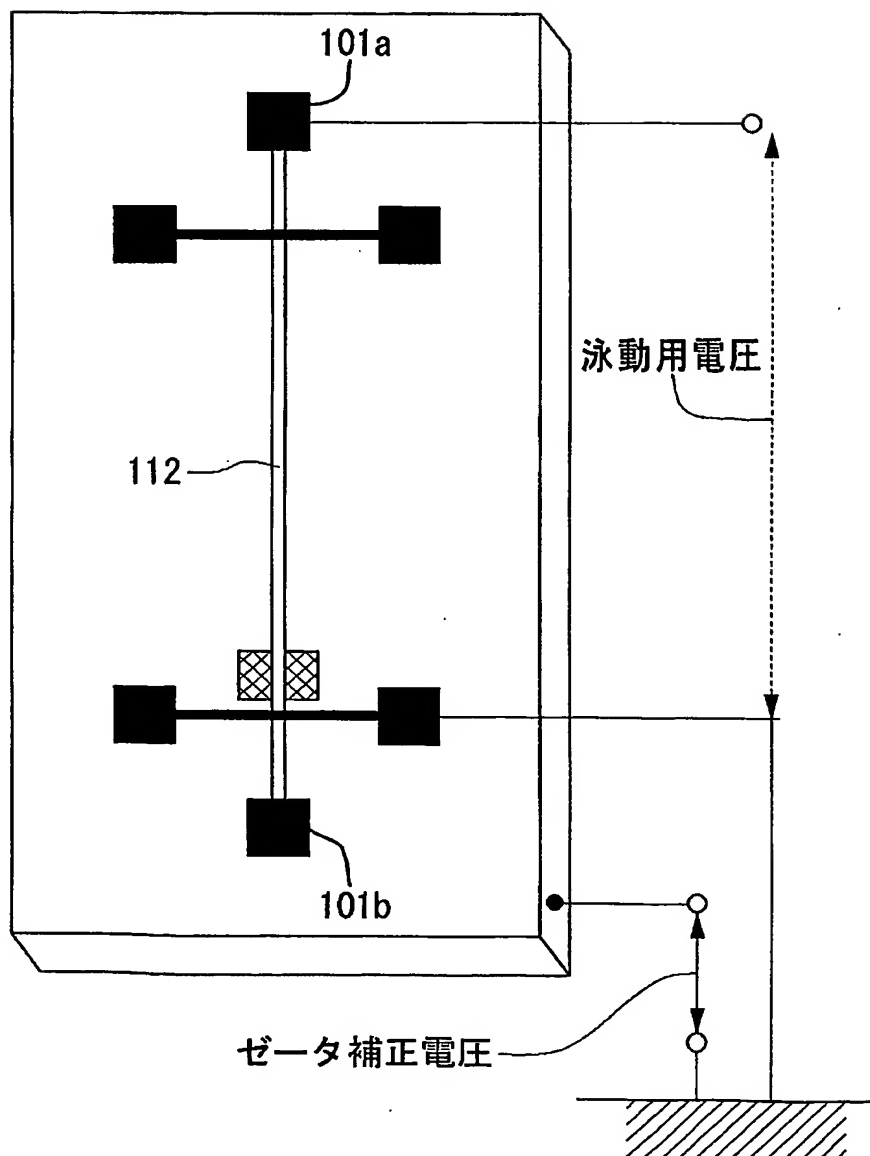
5/17

図 5



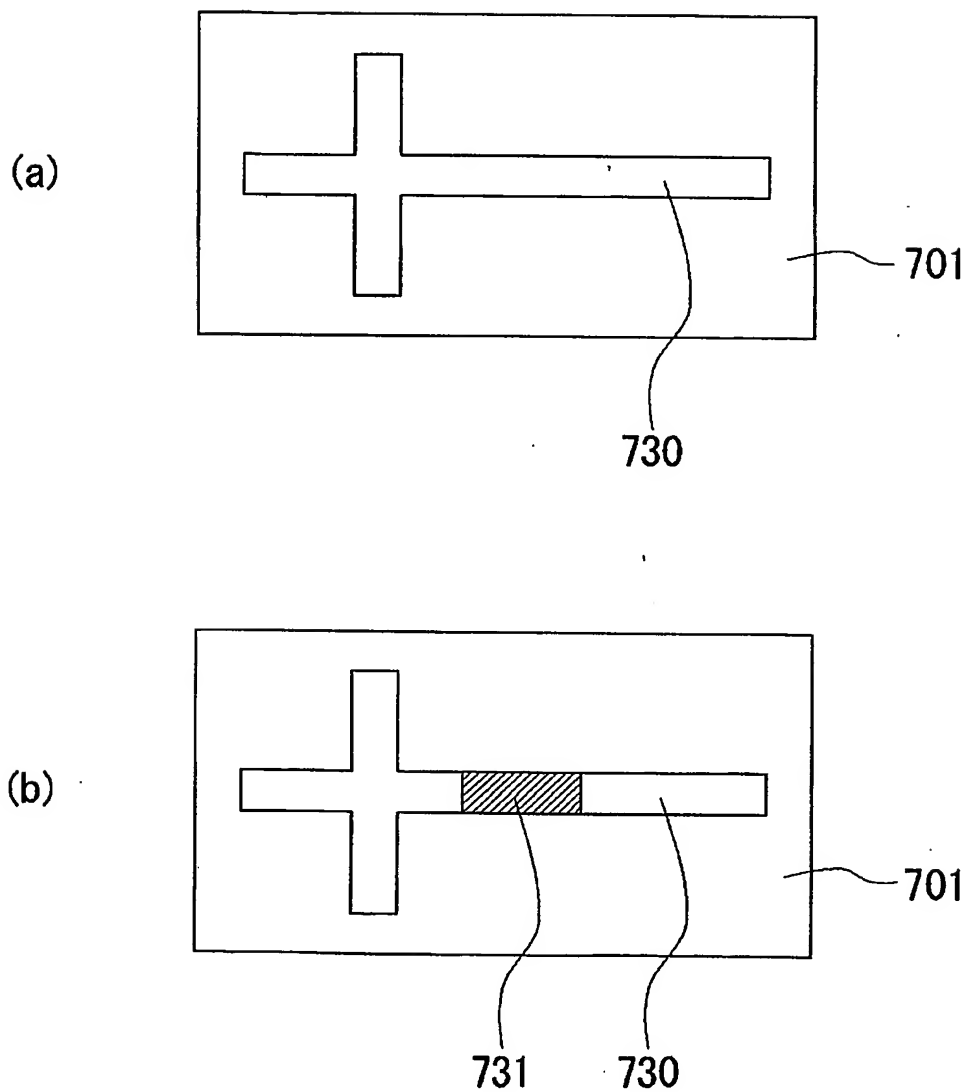
6/17

図 6



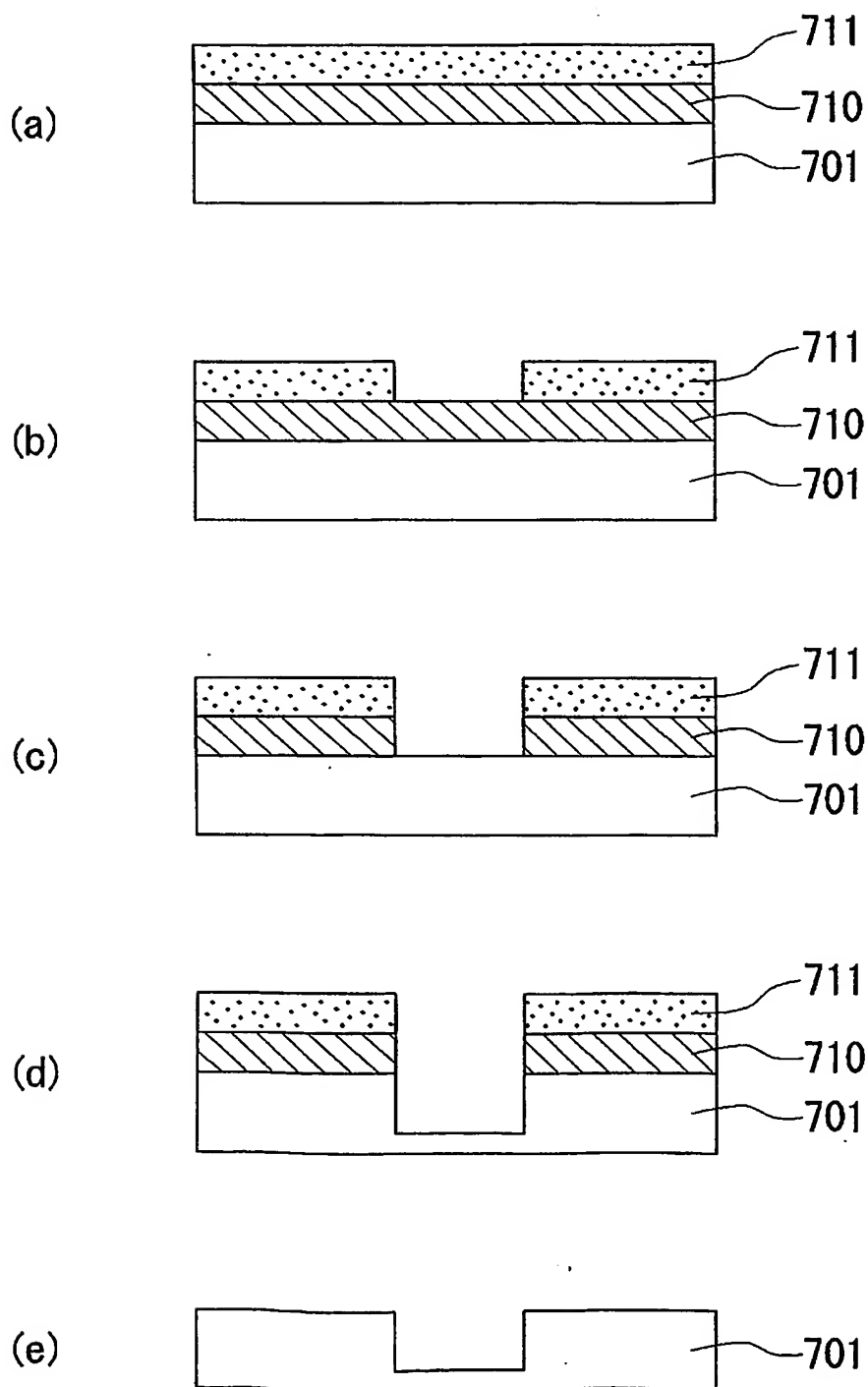
7/17

図 7



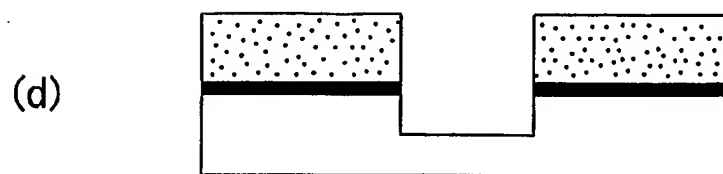
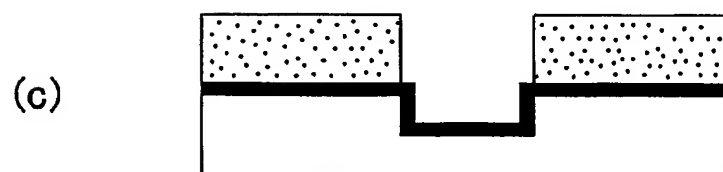
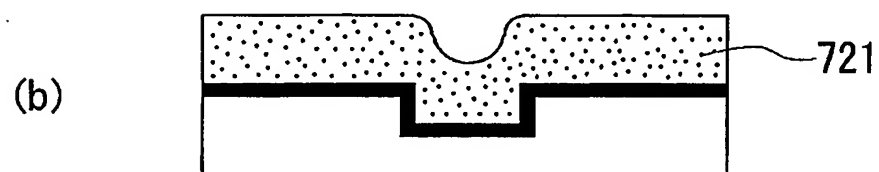
8/17

図 8



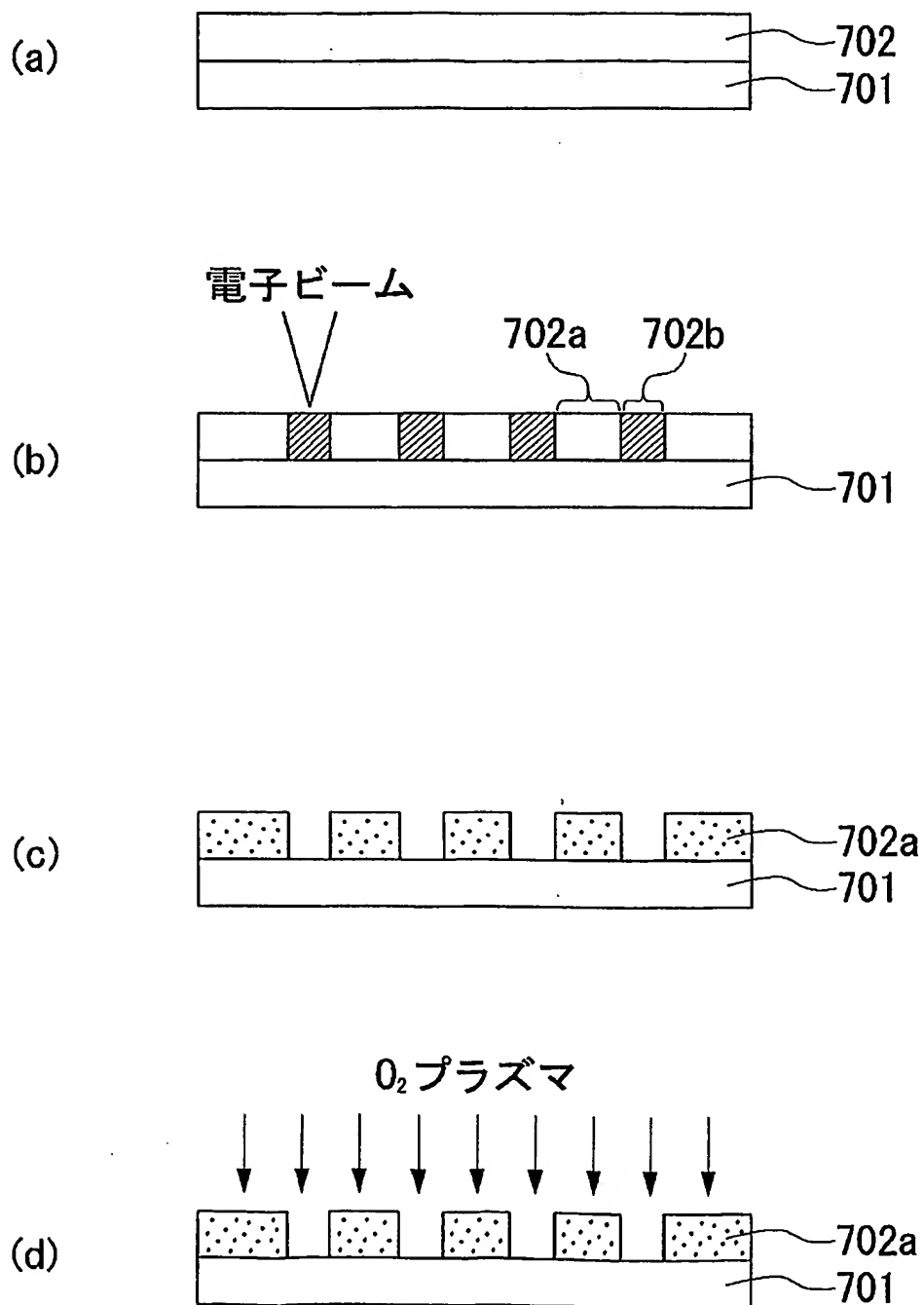
9/17

図 9



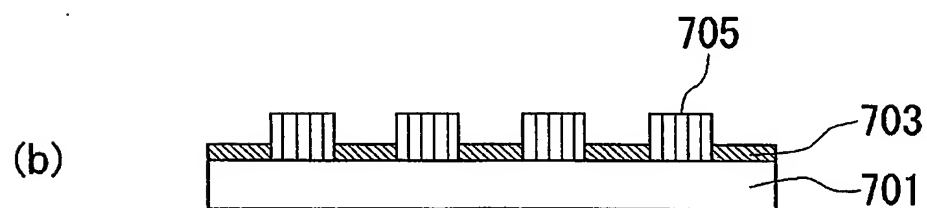
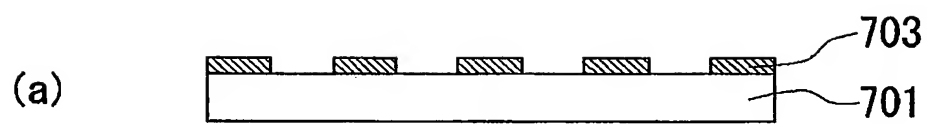
10/17

図 10



11/17

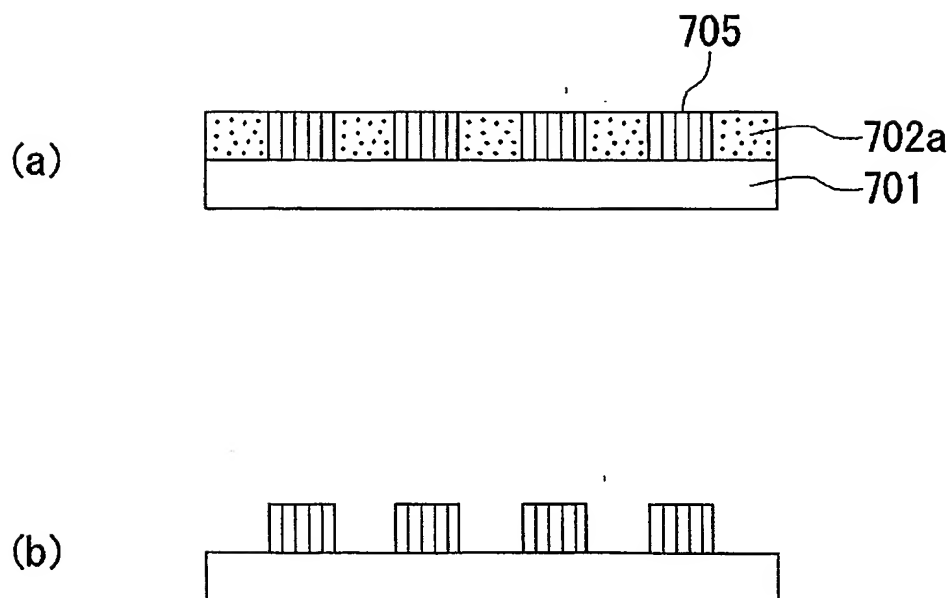
図 1 1





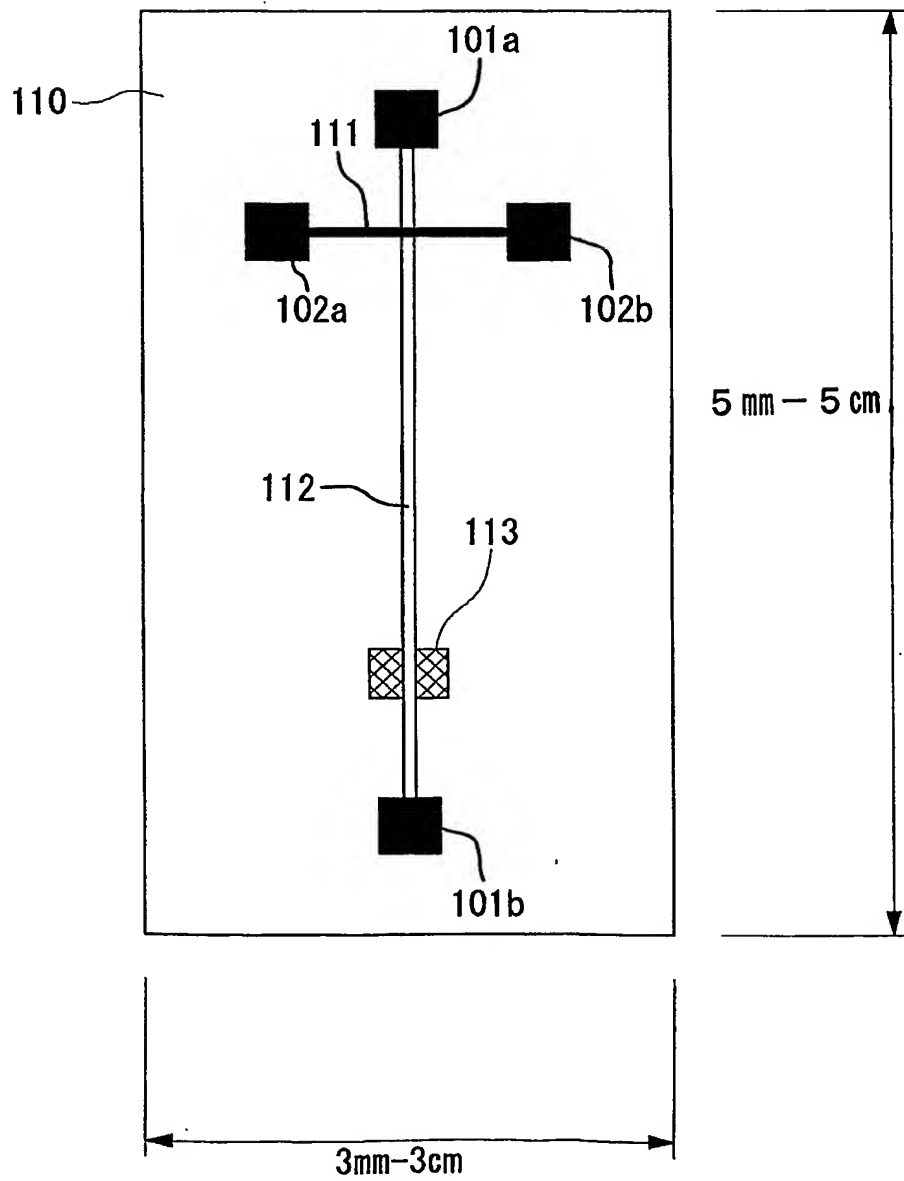
12/17

図 1 2



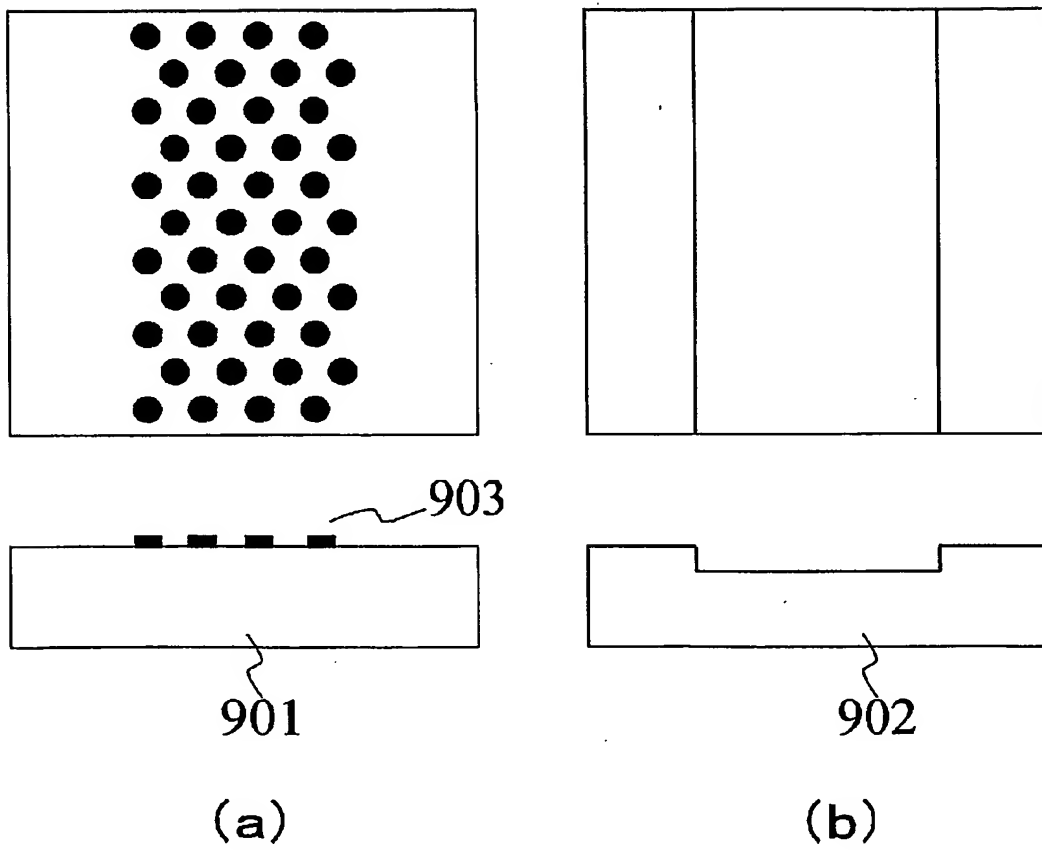
13/17

図 1 3



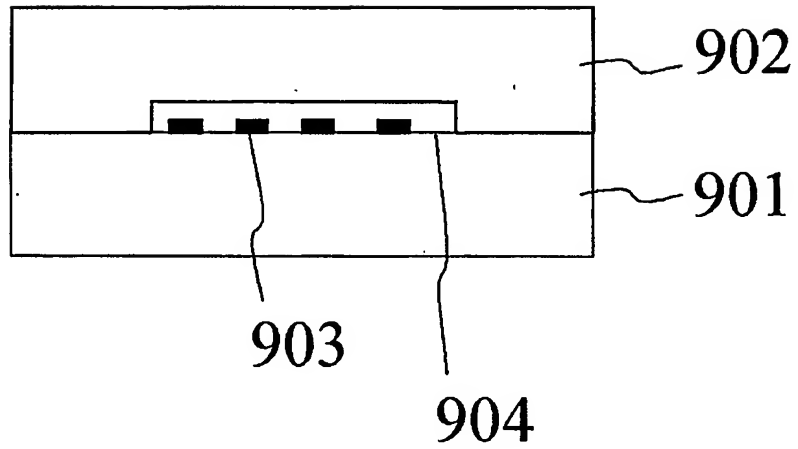
14/17

図 1 4



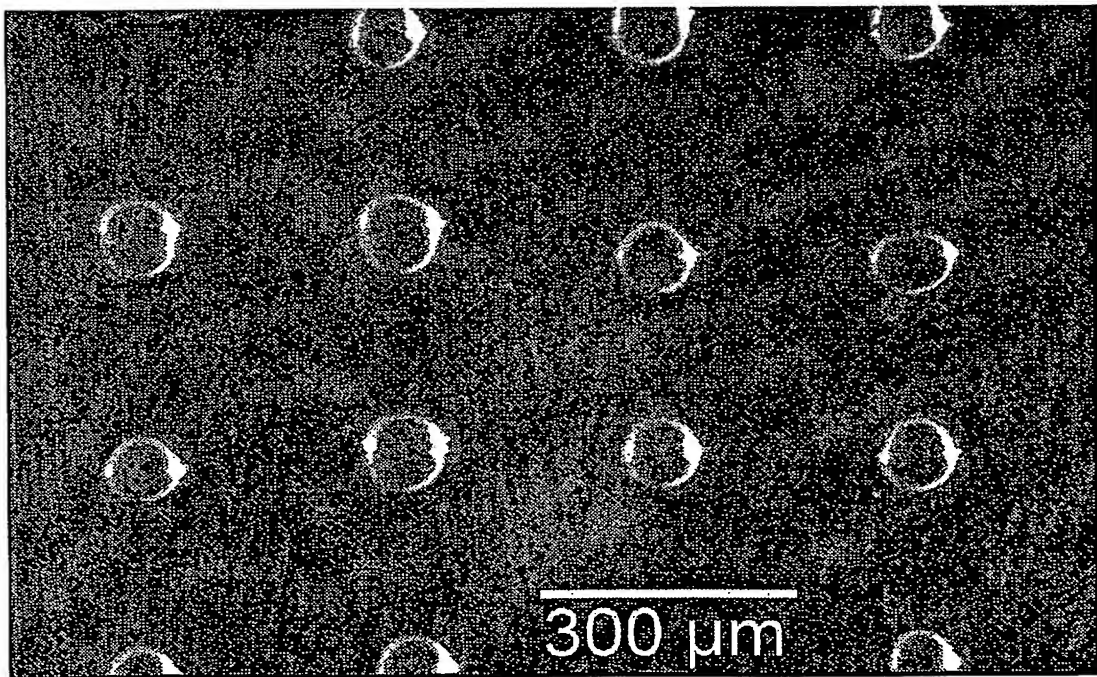
15/17

図 1 5



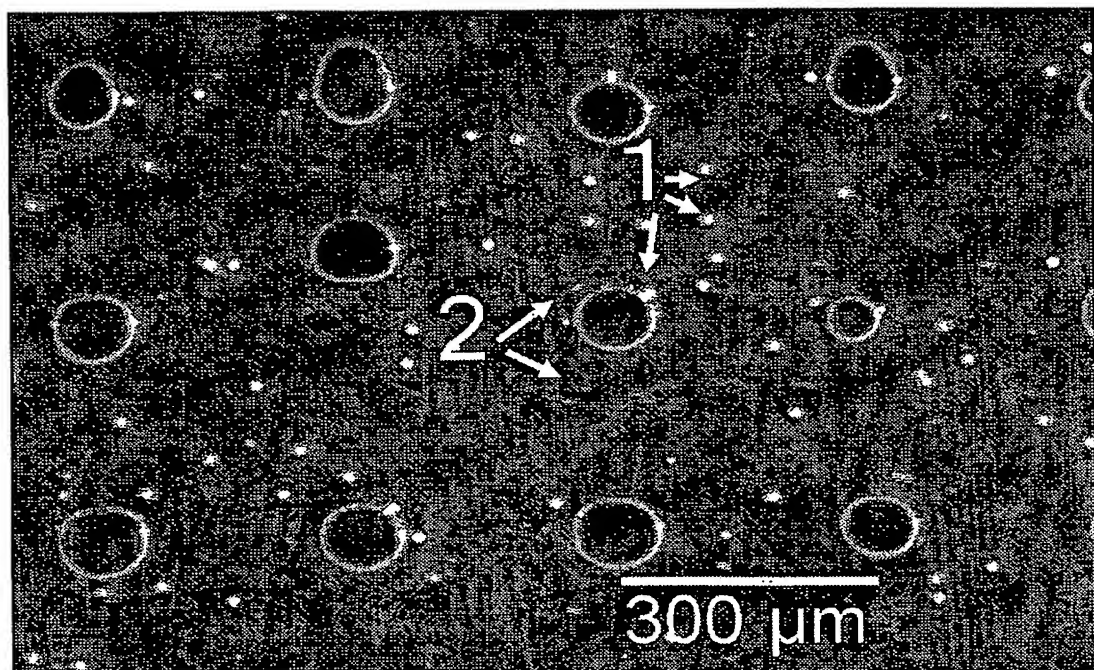
16/17

図16



17/17

図17



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP02/12131

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> G01N30/60, G01N27/447, G01N37/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> G01N30/60, G01N27/447, G01N37/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2002
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2002	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2002

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2001-518614 A (The Regents of the University of Michigan), 16 October, 2001 (16.10.01), & WO 99/17093 A & AU 9895775 A & EP 1017984 A & US 6130098 A	1-19
A	JP 2000-46797 A (Zaidan Hojin Kawamura Rikagaku Kenkyusho), 18 February, 2000 (18.02.00), (Family: none)	1-19
A	WO 00/21659 A (MOTOROLA INC.), 20 April, 2000 (20.04.00), & AU 9964184 A & EP 1123157 A & JP 2002-527254 A	1-19

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
---	--

Date of the actual completion of the international search  
19 December, 2002 (19.12.02)

Date of mailing of the international search report  
14 January, 2003 (14.01.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO2/12131

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>7</sup> G01N 30/60 G01N 27/447 G01N 37/00

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>7</sup> G01N 30/60 G01N 27/447 G01N 37/00

## 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年  
 日本国公開実用新案公報 1971-2002年  
 日本国登録実用新案公報 1994-2002年  
 日本国実用新案登録公報 1996-2002年

## 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 2001-518614 A(ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ ミシガン)2001.10.16 & WO 99/17093 A & AU 9895775 A & EP 1017984 A & US 6130098 A	1-19
A	JP 2000-46797 A(財団法人川村理化学研究所)2000.02.18 (ファミリーなし)	1-19
A	WO 00/21659 A(MOTOROLA INC.)2000.04.20 & AU 9964184 A & EP 1123157 A & JP 2002-527254 A	1-19

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19.12.02

国際調査報告の発送日

14.01.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)  
 郵便番号100-8915  
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

宮澤 浩

2J

9407

電話番号 03-3581-1101 内線 3251